

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.01.002

文章编号: 1005-8982(2020)01-0008-05

脊髓 IL-33 在关节炎大鼠痛觉过敏中的表达*

赵媛, 孔高茵, 周搏, 唐轶珣, 裴万敏, 潘冰冰

[湖南省人民医院(湖南师范大学第一附属医院)麻醉医学中心(湖南省围术期加速康复麻醉临床医学研究中心), 湖南长沙 410005]

摘要:目的 通过研究佐剂诱导关节炎大鼠脊髓组织中白细胞介素-33(IL-33)的变化情况,探讨IL-33在关节炎大鼠痛觉过敏中可能的作用。**方法** 50只成年雄性SD大鼠,体重200~250g,随机分为对照组(Sham组)与佐剂性关节炎组(CFA组),每组25只。CFA组采用足底注射完全氟式佐剂(CFA)复制模型,术后第1、3、7、14及21天分别处死5只大鼠,观察各组大鼠行为学变化,检测机械痛阈和热痛阈,并采用Western blotting检测脊髓IL-33的表达。**结果** CFA组大鼠自术后第3天起,各时间点的足趾和关节体积增大,与Sham组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),CFA组术后6h即出现机械痛阈和热痛阈明显下降,并持续至术后21天,与Sham组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。CFA组第3天开始出现脊髓IL-33的蛋白表达升高,并持续升高至术后21天,与Sham组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** CFA组大鼠出现机械痛敏和热痛敏,脊髓IL-33表达增加,IL-33有可能在类风湿性关节炎的痛觉过敏中起重要作用。

关键词: 类风湿性关节炎/关节炎,实验性;白细胞介素33;脊髓

中图分类号: R684

文献标识码: A

The expression and role of IL-33 in analgesic hypersensitivity of the adjuvant arthritis rats*

Yuan Zhao, Gao-yin Kong, Bo Zhou, Yi-xun Tang, Wan-min Pei, Bing-bing Pan

[Hunan Provincial People's Hospital (First Affiliated Hospital of Hunan Normal University),
Anesthesia department (Clinical Research Center for Anesthesiology of ERAS in
Hunan Province), Changsha, Hunan 410005, China]

Abstract: [Objective] To investigate the changes of interleukin-33 (IL-33) in spinal cord of rats with adjuvant arthritis and the possible role of IL-33 in hyperalgesia of arthritis. **[Method]** Fifty male SD rats, weighing 260 to 300 g, were randomly assigned to sham group and arthritis group. Adjuvant arthritis group were induced by complete Freund's adjuvant (CFA) injection. The behavioral changes of each group were observed. The mechanical pain threshold and thermal pain threshold were determined, and the expression of IL-33 in spinal cord was determined by Western blotting at 1d, 3d, 7d, 14d and 21d after surgery. **[Results]** From the three day after surgery, the swelling volume of the toes and joints in the CFA group was statistically different from that in the sham group ($P < 0.05$). Mechanical pain occurred 6 hours after operation in the CFA group. The threshold and thermal pain threshold decreased significantly and continued until 21 days after surgery. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). The protein expression of IL-33 in the spinal cord began to increase on the third day of the CFA group and continued to increase until 21 days after injection, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **[Conclusion]**

收稿日期: 2018-12-04

* 基金项目: 湖南省自然科学基金(No: 2018JJ3291), 湖南省卫生计生委科研基金(No: B2016017), 长沙市科技计划项目(No: ZD1702026)

[通信作者] 孔高茵, E-mail: konggaoyin@163.com

Increasing IL-33 expression in spinal cord may play an important role in the hyperalgesia of arthritis.

Keyword: adjuvant-induced arthritis; IL-33; spine

类风湿性关节炎是一种自身免疫性疾病, 常以进行性的关节肿胀、对称性、晨僵及疼痛为临床表现, 对患者生活质量造成很大的影响。类风湿性关节炎患者的病理学改变主要为关节腔内有大量炎症细胞浸润, 呈慢性炎症增生性改变。细胞因子是炎症的主要介质, 并且导致自身免疫疾病。白细胞介素-33 (Interleukin-33, IL-33) 属于 IL-1 细胞因子家族的成员, 参与各种炎症性疾病的发病机制^[1], 包括过敏性疾病^[2]、自身免疫性疾病^[3]、感染性疾病^[4]及神经性疼痛^[5]。有文献报道, IL-33/ST2 在以疼痛为重要临床表现的疾病中的适应性和先天性免疫应答中有着重要的作用^[6]。脑和脊髓是人体 IL-33 表达最多的部位^[7], 但类风湿关节炎患者中枢神经系统 IL-33 的表达尚无相关研究, 本研究通过检测佐剂诱导关节炎 (adjuvant induced arthritis, AIA) 大鼠脊髓中 IL-33 的表达, 探讨其在类风湿性关节炎中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

清洁级雄性 SD 大鼠, 体重 200 ~ 250 g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。7370 型热痛仪 (意大利 UGO 公司), VonFrey 机械痛阈测定套件 (美国 Stoelting 公司), 鼠抗 β -tubulin 多克隆抗体 (北京鼎国昌盛公司), 兔抗 IL-33 多克隆抗体 (NBP1-76394) (美国 Novus 公司), 辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG (美国 Jackson 公司), 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (美国 Jackson 公司), 完全氟式佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) (F-5881) (美国 Sigma 公司)。

1.2 模型复制与分组

大鼠以每笼 2 ~ 3 只群养, 适应生活环境 3 d 后开始实验, 50 只大鼠随机分为对照组 (Sham 组) 和佐剂性关节炎组 (CFA 组), 每组 25 只。Sham 组大鼠左侧足底给予 0.9% 生理盐水 100 μ l, CFA 组大鼠左侧足底皮肤注射 CFA (1 mg/ml) 100 μ l。

1.3 观察指标

1.3.1 关节形态学评估 关节和足趾体积测量使用足趾容积测量仪, 测量并计算大鼠左侧足趾和关节的体积, 评价大鼠足趾和关节肿胀程度。

1.3.2 行为学检测 行为学检测包括机械痛阈和热痛

阈检测, 分别于术前 1 天和术后第 1、3、7、14 和 21 天检测两组大鼠左侧后肢的机械痛阈 (paw withdrawal threshold, PWT) 和热痛阈 (paw withdrawal latency, PWL)。每间隔 5 ~ 10 min 重复检测 2 次, 取平均值。

1.3.3 脊髓 Western blotting 检测 两组分别在术后第 1、3、7、14 和 21 天处死 5 只大鼠, 沿棘突切开皮肤并去除棘突和椎板, 取出脊髓腰膨大, 提取各组细胞总蛋白, BCA 法检测蛋白浓度, 每孔蛋白上样量 50 μ g, 行 SDS-PAGE 电泳, 湿法转膜将蛋白转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入 IL-33 (1 : 1 000), β -Tublin (1 : 5 000) 一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。PBS 洗膜, 加入按一抗种属来源加入相应二抗。加入二抗后常温反应 2 h, 加入发光液, 运行 Image Lab 程序发光, 保存条带。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 不同时间点的比较采用重复测量设计的方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠足趾和关节体积的变化

Sham 组与 CFA 组大鼠足趾和关节体积的比较结果: ①不同时间点大鼠足趾和关节体积有差异 ($F = 478.846$, $P = 0.000$); ②两组大鼠足趾和关节体积有差异 ($F = 612.542$, $P = 0.000$); ③两组大鼠随时间的变化趋势有差异 ($F = 299.000$, $P = 0.000$)。CFA 组大鼠在术后第 3 天开始, 足趾和关节体积增大, 直至整个观察期 ($P < 0.05$)。见表 1 和图 1。

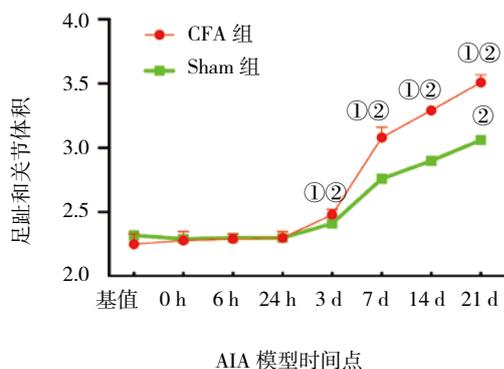
2.2 各组大鼠机械痛阈和热痛阈变化

Sham 组与 CFA 组大鼠机械痛阈和热痛阈变化的比较结果: ①不同时间点大鼠机械痛阈和热痛阈变化有差异 ($F = 151.033$ 和 57.641 , 均 $P = 0.000$); ②两组间大鼠机械痛阈和热痛阈变化有差异 ($F = 431.746$ 和 515.000 , 均 $P = 0.000$); ③ CFA 组与 Sham 组随时间的变化趋势有差异 ($F = 161.370$ 和 88.342 , 均 $P = 0.000$)。CFA 组大鼠在术后第 6 h 开始, 与术前比较, 机械痛阈和热痛阈均降低, 直至整个观察期 ($P < 0.05$)。见表 2、3 和图 2、3。

表 1 两组大鼠不同时间点足趾和关节体积比较 (n=25, $\bar{x} \pm s$)

组别	基值	0 h	6 h	24 h	3 d	7 d	14 d	21 d
CFA 组	2.25 ± 0.08	2.28 ± 0.07	2.29 ± 0.64	2.30 ± 0.05	2.48 ± 0.04 ^{①②}	3.08 ± 0.08 ^{①②}	3.29 ± 0.02 ^{①②}	3.51 ± 0.06 ^{①②}
Sham 组	2.32 ± 0.01	2.29 ± 0.05	2.30 ± 0.05	2.30 ± 0.40	2.41 ± 0.08	2.76 ± 0.39	2.90 ± 0.47	3.06 ± 0.53 ^②

注：基值为未用药前的数值；①与 Sham 组比较，P<0.05；②与基值比较，P<0.05。



①与 Sham 组比较，P<0.05；②与基值比较，P<0.05。

图 1 两组大鼠不同时间点足趾和关节体积变化

2.3 两组大鼠脊髓 IL-33 蛋白水平表达变化

Western blotting 检测各组大鼠脊髓 IL-33 的蛋白表达的比较结果：① Sham 组各时间点大鼠脊髓 IL-33 蛋白表达水平比较差异无统计学意义 ($F=1\ 356.316, P=23.317$)；② CFA 组大鼠从第 3 天开始脊髓 IL-33 蛋白表达水平增加，差异有统计学意义 ($F=33\ 423.543, P=0.000$)；③ CFA 组与 Sham 组随时间的变化趋势比较，差异有统计学意义 ($F=31\ 856.357, P=0.000$)。见表 4 和图 4、5。

表 2 两组不同时间点机械痛阈比较 (n=25, $\bar{x} \pm s$)

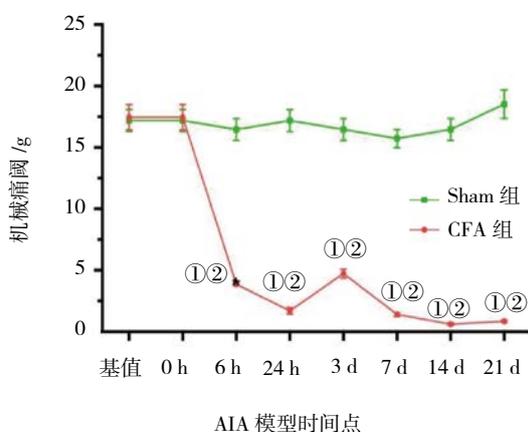
组别	基值	0 h	6 h	24 h	3 d	7 d	14 d	21 d
CFA 组	17.46 ± 2.32	17.47 ± 2.31	3.86 ± 0.30 ^{①②}	1.69 ± 0.60 ^{①②}	4.73 ± 0.83 ^{①②}	1.4 ± 0.34 ^{①②}	0.61 ± 0.23 ^{①②}	0.85 ± 0.20 ^{①②}
Sham 组	17.20 ± 2.01	17.20 ± 2.01	16.47 ± 2.01	17.20 ± 2.01	16.47 ± 2.01	15.73 ± 1.64	16.47 ± 2.01	18.53 ± 2.61

注：基值为未用药前的数值；①与 Sham 组比较，P<0.05；②与基值比较，P<0.05。

表 3 两组不同时间点热痛阈比较 (n=25, $\bar{x} \pm s$)

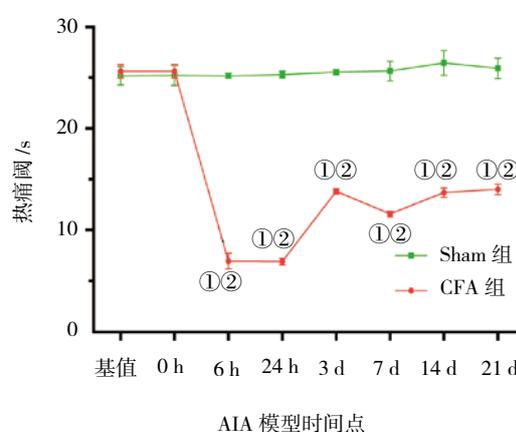
组别	基值	0 h	6 h	24 h	3 d	7 d	14 d	21 d
CFA 组	25.63 ± 1.52	25.63 ± 1.52	6.95 ± 1.71 ^{①②}	6.9 ± 0.73 ^{①②}	13.81 ± 0.55 ^{①②}	11.58 ± 0.65 ^{①②}	13.69 ± 1.05 ^{①②}	14.0 ± 1.13 ^{①②}
Sham 组	25.20 ± 2.02	25.24 ± 2.17	25.19 ± 0.52	25.30 ± 0.79	25.57 ± 0.57	25.65 ± 2.17	26.45 ± 2.73	25.93 ± 2.25

注：基值为未用药前的数值；①与 Sham 组比较，P<0.05；②与基值比较，P<0.05。



①与 Sham 组比较，P<0.05；②与基值比较，P<0.05。

图 2 两组大鼠不同时间点机械痛阈的变化



①与 Sham 组比较，P<0.05。②与基值比较，P<0.05。

图 3 两组大鼠不同时间点热痛阈的变化

表 4 两组大鼠脊髓 IL-33 蛋白水平表达比较 ($n=25, \bar{x} \pm s$)

组别	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d
CFA 组	7 678.62 ± 161.90	12 889.60 ± 135.55 ^{①②}	18 861.37 ± 167.64 ^{①②}	20 114.61 ± 78.47 ^{①②}	19 434.54 ± 514.97 ^{①②}
Sham 组	7 073.99 ± 141.04	7 023.81 ± 91.95	7 145.91 ± 143.82	7 014.39 ± 97.03	7 018.73 ± 90.58

注: ①与 Sham 组比较, $P < 0.05$; ②与 1 d 比较, $P < 0.05$ 。

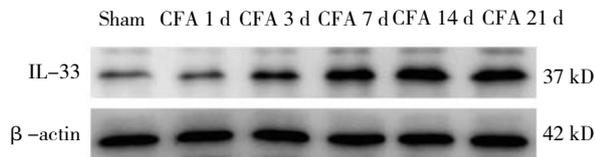
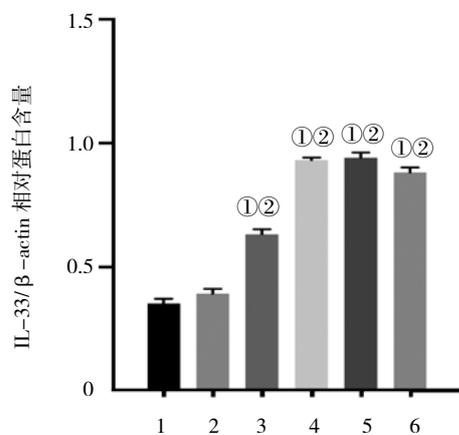


图 4 Western blotting 法检测两组大鼠不同时间点脊髓 IL-33 的表达



1: Sham; 2: CFA 1 d; 3: CFA 3 d; 4: CFA 7 d; 5: CFA 14 d; 6: CFA 21 d; ①与 Sham 组比较, $P < 0.05$ 。②与 CFA 1 d 比较, $P < 0.05$ 。

图 5 两组大鼠不同时间点脊髓 IL-33 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

10 年前 IL-33 被确认为 IL-1 家族中的一员, 认为在先天和适应性方面起着关键免疫作用, IL-33 与其独特的受体 ST2 在炎症和免疫介导的疾病中起重要作用^[8]。IL-33 通常由损伤或坏死释放屏障细胞 (内皮细胞和上皮细胞), 类似于警示的作用^[9]。有研究表明, 在 CIA 模型中, IL-33 可以加重关节炎的症状^[10], 在 RA 大鼠的滑膜中可以检测到 IL-33 和 ST2, 其中 IL-33 水平较高^[11]。提示类风湿关节炎与外周 IL-33 升高关系密切。

在所有器官研究中, 中枢神经系统的 IL-33 表达水平最高, IL-33 和 ST2 由多种细胞表达, IL-33 通过大胶质细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞^[12]表达, ST2 通过小胶质细胞^[13]表达。有研究显示^[14], 在 CFA 小鼠中, 脊髓星形胶质细胞在关节炎发作后第 10 天

开始增加。IL-33 像 IL-1 其他细胞因子一样, 会导致周围神经系统炎症疼痛和调解抗原诱导的皮肤和关节的痛觉过敏, VERRI 等^[15]研究表明, IL-33 可能诱发小鼠关节和皮肤痛觉过敏的产生, 提示 IL-33 在关节炎疼痛中起关键作用。但在 CFA 大鼠脊髓是否会出现 IL-33 相应的表达变化尚无相关研究。

本实验研究发现, 当大鼠足底注射弗氏完全佐剂后 6 h 开始出现机械痛阈和热痛阈明显下降, 到第 3 天两者都有轻度恢复继之下降的过程, 总体呈下降的趋势, 提示实验组大鼠注射弗氏佐剂后 6 h 即出现痛觉过敏。观察到大鼠足趾和关节变化也提示关节炎的形成。与此同时检测相应时间点的脊髓 IL-33 蛋白, 发现第 3 天脊髓 IL-33 蛋白水平开始明显升高, 此后一直持续到第 21 天。该结果提示, 当 CFA 大鼠形成早期的痛觉过敏时, 脊髓 IL-33 并未参与, 3 d 后脊髓 IL-33 明显升高, 说明 CFA 大鼠后期的痛觉过敏形成与脊髓 IL-33 相关。

综上所述, 根据 IL-33 在佐剂关节炎大鼠脊髓的表达, 笔者认为 IL-33 在类风湿关节炎疼痛过敏中扮演重要角色, 如果通过调控脊髓 IL-33 水平进而调节其炎症反应和中枢敏化, 有可能减轻类风湿关节炎患者的疼痛, 但是这需要更进一步和大样本的研究。

参 考 文 献:

- [1] ABD RACHMAN I M F, CHIN V K, ABD MAJID R, et al. Critical roles of IL-33/ST2 pathway in neurological disorders[J]. Mediators Inflamm, 2018, 2018: 5346413.
- [2] GUPTA R K, GUPTA K, DWIVEDI P D. Pathophysiology of IL-33 and IL-17 in allergic disorders[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2017, 38: 22-36.
- [3] THEOHARIDES T C, PETRA A I, TARACANOVA A, et al. Targeting IL-33 in autoimmunity and inflammation[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2015, 354(1): 24-31.
- [4] XU D, JIANG H R, KEWIN P, et al. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(31): 10913-10918.
- [5] FATTORI V, HOHMANN M S N, ROSSANEIS A C, et al. Targeting IL-33/ST2 signaling: regulation of immune function and analgesia[J]. Expert Opin Ther Targets, 2017, 21(12): 1141-1152.

- [6] CHEN W Y, TSAI T H, YANG J L, et al. Therapeutic strategies for targeting IL-33/ST2 signalling for the treatment of inflammatory diseases[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(1): 349-358.
- [7] PICHERY M, MIREY E, MERCIER P, et al. Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: in situ analysis using a novel IL-33-LacZ gene trap reporter strain[J]. *J Immunol*, 2012, 188(7): 3488-3495.
- [8] STAURENGO-FERRARI L, TREVELIN S C, FATTORI V, et al. Interleukin-33 receptor (ST2) deficiency improves the outcome of staphylococcus aureus-induced septic arthritis[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 962.
- [9] CAYROL C, GIRARD J P. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy[J]. *Curr Opin Immunol*, 2014, 31: 31-37.
- [10] XU D, JIANG H R, KEWIN P, et al. IL-33 exacerbates antigen-induced arthritis by activating mast cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(31): 10913-10918.
- [11] PALMER G, TALABOT-AYER D, LAMACCHIA C, et al. Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(3): 738-749.
- [12] GADANI S P, WALSH J T, SMIRNOV I, et al. The glia-derived alarmin IL-33 orchestrates the immune response and promotes recovery following CNS injury[J]. *Neuron*, 2015, 85(4): 703-709.
- [13] YASUOKA S, KAWANOKUCHI J, PARAJULI B, et al. Production and functions of IL-33 in the central nervous system[J]. *Brain Res*, 2011, 1385: 8-17.
- [14] INGLIS J J, NOTLEY C A, ESSEX D, et al. Collagen-induced arthritis as a model of hyperalgesia: functional and cellular analysis of the analgesic actions of tumor necrosis factor blockade[J]. *Arthritis Rheum*, 2007, 56(12): 4015-4023.
- [15] VERRI W A, GUERRERO A T, FUKADA S Y, et al. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(7): 2723-2728.

(张西倩 编辑)